

# La broncopneumopatia cronica ostruttiva come malattia ossidativa e infiammatoria sistemica: implicazioni fisiopatologiche e terapeutiche

## COPD as a oxidative and inflammatory systemic disease: pathophysiologic and therapeutic implications

Marco Mura

### Riassunto

Accanto alle tipiche manifestazioni polmonari della broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) sono state descritte una serie di alterazioni a livello sistemico, quali infiammazione, stress ossidativo, perdita di peso, perdita di massa cellulare corporea, osteoporosi e disfunzione muscolare scheletrica. Tali alterazioni sono clinicamente rilevanti e potenzialmente utili per una più completa classificazione della malattia. La presente rassegna discute l'infiammazione sistemica e lo stress ossidativo quali costituenti principali della componente sistemica della BPCO e prende in esame l'impatto di tali alterazioni sulla fisiopatologia della malattia, oltre alle possibili implicazioni terapeutiche. In particolare, l'azione inibitoria che la carbocisteina sale di lisina monoidrato effettua sull'attività chemiotattica e la capacità di adesione alle cellule endoteliali dei neutrofili, la principale fonte di radicali liberi dell'ossigeno e citochine proinfiammatorie nella BPCO, rende questo agente assai promettente nel trattamento della componente sistemica della malattia, anche se trials randomizzati e controllati sono necessari per studiarne l'efficacia clinica.

**Parole chiave:** BPCO, infiammazione sistemica, stress ossidativo, disfunzione muscolare scheletrica, antiossidanti.

### Summary

Together with the typical pulmonary manifestations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), several systemic alterations have been described, such as inflammation, oxidative stress, loss of weight and body cell mass, osteoporosis and skeletal muscle dysfunction. These alterations are clinically relevant and potentially useful for a more complete classification of the disease. The present review discusses systemic inflammation and oxidative stress as the main features of the systemic component in COPD, their pathophysiological relevance and the possible therapeutic implications. In particular, given that carbocysteine lysine salt monohydrate inhibits the chemotactic activity and adhesion capacity of neutrophils, which are the main source of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in COPD, this drug may be useful in the treatment of the systemic component of the disease, though randomized and controlled trials are necessary to investigate its actual clinical efficacy.

**Keywords:** COPD, systemic inflammation, oxidative stress, skeletal muscle dysfunction, anti-oxidants.

### Introduzione

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) diventerà la quinta malattia più diffusa nel mondo e la terza maggiore causa di mortalità entro

il 2020 (30). Tradizionalmente, la comprensione di questa malattia dal punto di vista fisiopatologico si è focalizzata sulla presenza di ostruzione al flusso aereo; tuttavia quest'ultima si associa ad una anormale risposta infiammatoria

alla noxa patogena non solo a livello polmonare, ma anche sistemico (1). La BPCO può essere quindi considerata come una malattia con più componenti. La presente rassegna si focalizzerà sulla componente sistemica, con particolare riferi-

Marco Mura

Dottore di Ricerca in Scienze Pneumo-Cardio-Toraciche  
Thoracic Surgery Research Laboratory, Toronto General Hospital Research Institute, Toronto, Ontario, Canada  
Dipartimento di Medicina Interna, Università Tor Vergata, Roma

mento all'infiammazione ed allo stress ossidativo e sulle loro implicazioni fisiopatologiche e terapeutiche. Gli effetti sistemici più comunemente associati alla BPCO comprendono infiammazione sistemica, stress ossidativo, disfunzione della muscolatura scheletrica, perdita di peso, anomalie dello stato nutritivo ed osteoporosi. Il contributo della componente sistemica al quadro patologico della BPCO varia da paziente a paziente, a seconda della predisposizione genetica, della presenza di fattori confondenti, quali diabete e malattie cardiache e della eventuale persistenza delle abitudini al fumo.

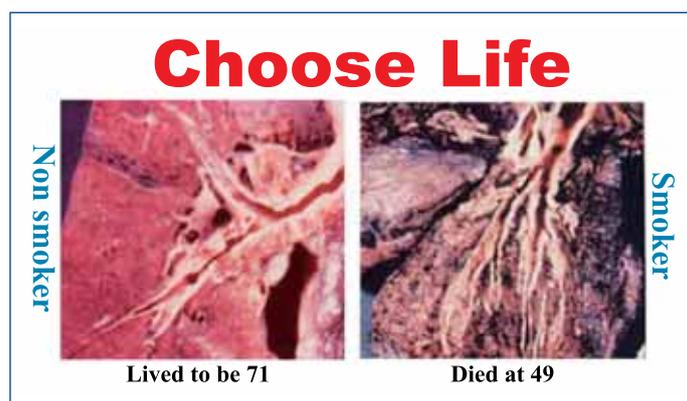
### L'infiammazione sistemica

L'infiammazione nella BPCO è cronica e risulta in una malattia eterogenea, caratterizzata da alterazioni morfologiche a livello delle vie aeree centrali (*bronchite*), periferiche (*malattia delle piccole vie aeree*) e del parenchima polmonare (*enfisema*) (19, 28). L'infiammazione a livello extra-polmonare gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi della componente sistemica della BPCO.

L'esposizione al fumo di tabacco stimola una risposta infiammatoria nel polmone, con la conseguente infiltrazione di neutrofili, macrofagi e linfociti (37, 39), cellule in grado di rilasciare citochine proinfiammatorie quali l'interleuchina 8 (IL-8), l'interleuchina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), e il tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (18), oltre alle proteasi responsabili della distruzione del parenchima. L'ipotesi secondo cui l'entità della risposta infiammatoria sia diversa nei fumatori con e senza BPCO è attualmente oggetto di intense ricerche (1).

Le citochine proinfiammatorie nel siero sono state oggetto di ricerche quali possibili responsabili dell'infiammazione sistemica nella BPCO. I monociti isolati dal siero dei pazienti broncopneuropatici, soprattutto quelli con basso indice di massa corporea, sono infatti in grado di rilasciare maggiori quantità di TNF- $\alpha$  rispetto ai soggetti normali (10). L'IL-8 e il TNF- $\alpha$  possono non solo passare nella

circolazione sistemica, ma potrebbero anche incrementare il numero di cellule infiammatorie sistemiche durante il loro transito nella circolazione polmonare (2). Anche l'espressione delle molecole di adesione nei neutrofili e nelle cellule endoteliali dei pazienti con BPCO risulta alterata rispetto ai soggetti normali, con un incremento della espressione della *Mac-1* (CD11b/CD18) a livello dei neutrofili, insieme ad una riduzione dei livelli della *intercellular adhesion molecule* (sICAM-1), il che suggerisce la presenza di una possibile disfunzione endoteliale sistemica (31), visto che i livelli circolanti di ICAM-1 sono considerati un surrogato dell'espressione a livello endoteliale (47). L'aumentata espressione delle molecole di adesione superficiale nei neutrofili circolanti dei pazienti con BPCO ne facilita il reclutamento nei siti di infiammazione (2).



Un altro fattore che potrebbe contribuire al mantenimento della infiammazione sistemica è l'ipoossiemia, che determina una aumentata produzione di citochine da parte dei macrofagi e l'attivazione del sistema TNF (48). Correlazioni inverse tra PaO<sub>2</sub> arteriosa ed i livelli circolanti di TNF- $\alpha$  e del recettore TNFR sono state in effetti osservate in pazienti con BPCO (44). L'*hypoxia inducible factor 1* segnala inoltre la presenza di ipoossia dando il via alla trascrizione di molteplici geni coinvolti nei processi di angiogenesi, eritropoiesi, proliferazione cellulare, rimodellamento vascolare, risposte vasomotorie ed infiammazione (42).

### Lo stress ossidativo

Il termine stress ossidativo sta ad indicare tutte le alterazioni funzionali e struttu-

rali causate dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS) (2). Il fumo di tabacco è già di per sé una potente sorgente di ROS (23, 50). Pertanto gli aumentati livelli di ROS, prodotti in particolare dai neutrofili, nei pazienti con BPCO non possono che ridurre ulteriormente le capacità antiossidanti, oltre a causare danno epiteliale, attivazione dei macrofagi residenti nelle vie aeree, squilibrio tra proteasi ed anti-proteasi (23) ed aumentato rischio di sviluppare cancro polmonare (49). Lo stress ossidativo è considerato uno dei fattori più importanti contribuenti alla componente sistemica della BPCO. Numerosi studi hanno riportato alterazioni nei livelli di stress ossidativo, citochine circolanti, proteine della fase acuta e nel livello di attivazione delle cellule circolanti nella BPCO (47). In particolare durante le esacerbazioni acute della BPCO è stato dimostrato un marcato squilibrio tra

ossidanti ed antiossidanti (35). Tuttavia, l'ossidazione è presente anche in condizioni stabili di malattia, come dimostrato dagli elevati livelli di perossidazione lipidica, un marker dello stress ossidativo, riportati nel siero dei pazienti con BPCO stabile (35). A conferma di questo, i leucociti dei soggetti fumatori rilasciano maggiori quantità di radicale superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e di perossido

di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) rispetto ai controlli sani (25). Le specie ossidanti, a loro volta, si sono dimostrate in grado di modificare la trascrizione dei geni alterando l'attività di fattori di trascrizione redox-sensibili (19). Il fattore di trascrizione *Nuclear Factor kappa b* (NF- $\kappa$ B) è regolato, tra gli altri fattori, anche dagli ossidanti (17, 38), e gioca un ruolo fondamentale nella infiammazione cronica e nella sopravvivenza cellulare (6).

La relazione tra infiammazione e stress ossidativo è quindi complessa. Il fattore comune ad entrambe le componenti è la *NF- $\kappa$ B pathway* (proinfiammatoria ed antiapoptotica) che, una volta attivata, da un lato stimola l'espressione di citochine proinfiammatorie e di molecole di adesione dall'altro, è anche redox-dipendente e può essere attivata dallo stress ossidativo,

come già sottolineato (17, 38).

Di seguito verranno presi in esame le disfunzioni della massa cellulare corporea e della muscolatura scheletrica ed il ruolo svolto dall'ossidazione ed infiammazione sistemica nella loro patogenesi.

### Alterazioni della massa cellulare corporea

La perdita di tessuto metabolizzante caratterizza molte malattie croniche, inclusa la BPCO. La massa cellulare corporea (MCC) è un indice che rappresenta il tessuto attivamente metabolizzante (nei vari organi) e il tessuto capace di attività contrattile (nei muscoli) (47). Cambiamenti della MCC possono essere riconosciuti clinicamente da perdita di peso e perdita della massa "fat-free" ("magra" - MFF). Quest'ultima include un compartimento cellulare, ovvero la MCC, che rappresenta la parte scambiante energia, ed un compartimento extracellulare (47). Una selettiva perdita della MFF è stata riportata nella BPCO, con una prevalenza variabile tra il 20 e il 35% dei pazienti (13, 41). La perdita di MFF si ripercuote negativamente sulla funzione respiratoria (5) e muscolare (14), nonché sulla capacità di esercizio (32) e sulla qualità di vita (26).

È stato inoltre dimostrato che un basso indice di massa corporea si associa ad aumentata mortalità nei pazienti affetti da BPCO (40) ed infatti questo indice è stato incluso nel nuovo score multidimensionale (BODE index), altamente predittivo della mortalità, messo a punto da Celli e Coll. (9).

Uno squilibrio del processo di degradazione e sostituzione proteica, presente anche in condizioni cliniche stabili, sembra essere alla base della perdita di MCC e MFF, anche se gli studi a disposizione sono ancora pochi. Uno studio di Engelen et al. ha dimostrato alterazioni nel processo di degradazione e sintesi proteica mediante lo studio del metabolismo di isotopi (L-[ring-(2)H(5)]phenylalanina e L-[ring-(2)H(2)]tyrosina) iniettati endovena in 14 pazienti con BPCO, con un turnover più elevato in questi ultimi rispetto ai controlli sani (12).

### La disfunzione muscolare scheletrica

La disfunzione della muscolatura schele-

trica limita fortemente la capacità di esercizio dei pazienti broncopneuropatici e deriva sia da una riduzione della massa muscolare che da un'alterazione funzionale della massa rimanente, soprattutto a carico del diaframma (33), ma anche dei muscoli periferici.

La perdita di massa muscolare scheletrica, specialmente a livello degli arti inferiori ed interessante in particolare le fibre di tipo II, è stata documentata da Gosker e Coll. (15). La riduzione della massa muscolare si correla alla infiammazione sistemica (47) e con lo stress ossidativo (8). Le alterazioni dello scambio gassoso polmonare giocano probabilmente un ruolo in tale disfunzione muscolare, a causa della attivazione del sistema TNF, come già visto (2).

Gli aumentati livelli sierici di TNF- $\alpha$ , una citochina in grado di causare cachessia negli animali di laboratorio, potrebbero dare il via alla morte cellulare delle cellule muscolari scheletriche (10), oltre a determinare stress ossidativo, riduzione dell'espressione di miosina creatinina fosfochinasi e disfunzione contrattile (8).

Gli aumentati livelli sierici di TNF- $\alpha$  non possono essere legati ad una ridotta clearance renale, visto che in uno studio specifico sul TNF- $\alpha$  nei pazienti affetti da BPCO la funzione renale si manteneva nei limiti della normalità (11).

Li et al. hanno dimostrato che il trattamento con TNF- $\alpha$  dei miotubi differenziati determina una riduzione del contenuto proteico totale dose-dipendente e progressiva nel tempo. Tali effetti diretti sulle fibre muscolari scheletriche si manifestavano a concentrazioni di TNF- $\alpha$  simili a quelle presenti nel plasma dei pazienti affetti da BPCO (21).

Le citochine infiammatorie sembrano inoltre determinare alterazioni nella regolazione della differenziazione delle fibre muscolari scheletriche. Langen et al. hanno dimostrato che l'attivazione della *NF-kB pathway* determinata da TNF- $\alpha$  ed IL-1, interferiva con la differenziazione dei miofibroblasti (20).

Nei soggetti broncopneuropatici i livelli di peossidazione lipidica nel siero e nella muscolatura scheletrica aumentano dopo un esercizio muscolare non necessariamente massimale e si accompagna ad un aumento del rapporto GSSG

(glutazione ossidato)/GSH (glutazione ridotto) (34, 46). Sempre a carico del muscolo scheletrico è stato riportata una elevata incidenza di inclusioni di lipofuscina, un marker del danno ossidativo cumulativo, nel vasto laterale di soggetti affetti da BPCO (3). Le proteine dell'apparato contrattile possono essere esse stesse ossidate dai ROS, compromettendo lo sviluppo della forza contrattile (22). Infine, lo stress ossidativo inibisce l'espressione delle proteine muscolo-specifiche; la conseguente atrofia muscolare potrebbe così ulteriormente contribuire alla disfunzione contrattile (8).

Considerando nell'insieme le evidenze sperimentali suddette, risulta chiaro quanto sia importante mantenere un normale bilancio ossidativo per ottimizzare la funzione muscolare. Tale regolazione, tuttavia, risulta compromessa nella BPCO.

### Osteoporosi

La prevalenza della osteoporosi nella BPCO è elevata e potrebbe essere spiegata da molteplici fattori quali malnutrizione, sedentarietà, fumo (51), trattamento con corticosteroidi ed infiammazione sistemica (2). È interessante notare come l'osso osteoporotico ed il polmone enfisematoso condividano le stesse alterazioni morfologiche, con una rarefazione del tessuto, suggerendo una possibile patogenesi comune (2), che però deve essere ancora chiarita.

### Implicazioni terapeutiche

Le anomalie descritte a livello sistemico potrebbero essere una causa, più che una conseguenza, della BPCO. A sostenere tale ipotesi sta la constatazione che solo una minoranza dei fumatori sviluppa la BPCO (52), suggerendo la coesistenza di fattori genetici. Le anomalie osservate a carico dei neutrofilii circolanti, per esempio, potrebbero essere l'espressione di tale predisposizione genetica alla malattia che rende le cellule più suscettibili al fumo di tabacco; i neutrofilii potrebbero pertanto rispondere in maniera più vigorosa alla noxa patogena, rilasciando maggiori quantità di ROS e citochine proinfiammatorie, dando il via ad un circolo vizioso che perpetua la malattia anche dopo la cessazione del fumo. Per verificare tale ipotesi, è neces-

sario tuttavia: 1) investigare la presenza di queste alterazioni nei soggetti fumatori prima che sviluppino la BPCO; 2) stabilire un sicuro nesso patogenetico tra ROS ed insorgenza di enfisema, infiammazione sistemica e disfunzione muscolare in modelli animali sperimentali; 3) dare il via a studi clinici controllati e randomizzati con agenti antiossidanti, di cui potrebbero beneficiare sia soggetti fumatori ancora "sani", a fine preventivo, che soggetti broncopneumopatici, al fine di stabilizzare la malattia.

Alcune evidenze sperimentali e cliniche incoraggiano l'utilizzo degli agenti ossidanti nella BPCO. Tudor e coll., in un modello animale di enfisema indotto dalla inattivazione farmacologica del *vascular endothelial growth factor* (un fattore di sopravvivenza delle cellule endoteliali), hanno dimostrato la presenza a livello delle pareti alveolari di una aumentata espressione di marker di stress ossidativo, quali lipidoperossidazione e frammentazione del DNA oligonucleosomale, in associazione con apoptosi delle cellule endoteliali ed epiteliali, che portava allo sviluppo di enfisema (45). Sul piano clinico, una positiva associazione tra assunzione di vitamine antiossidanti con la dieta e buona funzionalità polmonare è stata dimostrata da vari studi epidemiologici (19) (43).

Sulla base di queste evidenze si può dunque ipotizzare un possibile ruolo protettivo per gli agenti ossidanti nella BPCO.

La N-acetilcisteina (NAC) è un donatore tiolico ed è dotata di proprietà mucolitiche ed antiossidanti (29). La NAC agi-

sce come sorgente di gruppi sulfidrilici, aumentando i livelli di glutazione ridotto nelle cellule riducendo l'attività della NF- $\kappa$ B (36). Sadowska e Coll. hanno recentemente osservato una riduzione dei livelli plasmatici di IL-8 dopo 10 settimane di trattamento con NAC (600 mg/die) in 10 pazienti con BPCO, anche se i marker di stress ossidativo (superossido dismutasi, glutazione perossidasi, capacità anti-ossidante in equivalenti trolox) non erano influenzati significativamente (38). Questo rappresenta però al momento l'unico studio sulla NAC e la componente sistemica della BPCO ed il limitato numero di osservazioni induce alla prudenza nella interpretazione dei risultati.

La carbocisteina è dotata di attività anti-infiammatoria ed anti-ossidante, oltre che mucoregolatrice (27). In campo sperimentale, la somministrazione per via orale di carbocisteina si è dimostrata in grado di ridurre l'infiltrazione neutrofila a livello polmonare in risposta alla instillazione nelle vie aeree di IL-1, una delle citochine proinfiammatorie coinvolte nella componente sistemica della BPCO, ed anche dopo esposizione al fumo di tabacco (4). La carbocisteina, sale di lisina monoidrato, svolge inoltre una attività di scavenger nei confronti dei ROS prodotti *in vitro* da neutrofilii attivati, tramite l'ossidazione del proprio gruppo tioetere (7). Un'altra proprietà di questa molecola, dimostrata ancora *in vitro*, è quella di ridurre la produzione di IL-8 da parte di monociti sierici (7).

Da ultimo, l'azione diretta che la carbocisteina esercita sui neutrofilii, riducendo-

ne l'attività chemiotattica e la capacità di adesione alle cellule endoteliali (16), rende tale molecola particolarmente promettente come possibile agente terapeutico a livello sistemico della BPCO. La carbocisteina potrebbe quindi ridurre l'attivazione dei neutrofilii ed il rilascio di citochine e ROS, che sono alla base di tutte le manifestazioni sistemiche della BPCO. Trial clinici multicentrici sono tuttavia necessari per testare l'effettivo impatto della carbocisteina sulla componente sistemica della BPCO.

## Conclusione

La BPCO è associata ad una serie di manifestazioni extrapulmonari la cui insorgenza è in massima parte da ricollegarsi all'infiammazione sistemica ed allo stress ossidativo multiorgano. La cessazione del fumo determina un miglioramento della funzionalità polmonare ma non risolve la risposta infiammatoria né a livello delle vie aeree né a livello sistemico (24), suggerendo la presenza di meccanismi che perpetuano il processo infiammatorio una volta che esso si è stabilito. Data la rilevanza clinica di queste alterazioni, la componente sistemica della BPCO dovrebbe essere presa in considerazione per una più completa stadiazione della malattia. In aggiunta a questo, l'utilizzo dei farmaci anti-ossidanti potrebbe svolgere un ruolo protettivo sul bilancio ossidativo e di conseguenza, sull'infiammazione sistemica e sulla funzionalità muscolare scheletrica ma la loro efficacia deve essere confermata da studi clinici randomizzati e controllati su larga scala.

## Bibliografia

1. Agusti AG. COPD, a multicomponent disease: implications for management. *Respir. Med.*, 2005; 99: 670-82.
2. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.*, 2003; 21: 347-360.
3. Allaire J, Maltais F, LeBlanc P, Simard PM, Whittom F, Doyon JF, Simard C, Jobin J. Lipofuscin accumulation in the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Muscle Nerve*, 2002; 25: 383-389.
4. Asti C, Melillo G, Caselli GF, Daffonchio L, Hernandez A, Clavenna G, Omini C. Effectiveness of carbocysteine lysine salt monohydrate on models of airway inflammation and hyperresponsiveness. *Pharmacol. Res.*, 1995; 31: 387-392.
5. Baarends EM, Schols AM, Mostert R, Wouters EF. Peak exercise response in relation to tissue depletion in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.*, 1997; 10: 2807-2813.
6. Baeuerle PA. I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B structures: at the interface of inflammation control. *Cell*, 1998; 95: 729-731.
7. Brandolini L, Allegretti M, Berdini V, Cervellera MN, Mascagni P, Rinaldi M, Melillo G, Ghezzi P, Mengozzi M, Bertini R. Carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-LYS) is a selective scavenger of reactive oxygen intermediates (ROIs). *Eur. Cytokine Netw.*, 2003; 14: 20-26.
8. Buck M, Chojkier M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *Embo J.*, 1996; 15: 1753-1765.
9. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 350: 1005-1012.
10. de Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, Mancino J, Rogers RM. Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 153: 633-637.
11. Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary

- disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994; 150: 1453-1455.
12. Engelen MP, Deutz NE, Wouters EF, Schols AM. Enhanced levels of whole-body protein turnover in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000; 162: 1488-1492.
  13. Engelen MP, Schols AM, Baken WC, Wesseling GJ, Wouters EF. Nutritional depletion in relation to respiratory and peripheral skeletal muscle function in out-patients with COPD. *Eur. Respir. J.*, 1994; 7: 1793-1797.
  14. Engelen MP, Schols AM, Does JD, Wouters EF. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71: 733-738.
  15. Gosker HR, Engelen MP, van Mameren H, van Dijk PJ, van der Vusse GJ, Wouters EF, Schols AM. Muscle fiber type IIX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002; 76: 113-119.
  16. Ishii Y, Kimura T, Morishima Y, Mochizuki M, Nomura A, Sakamoto T, Uchida Y, Sekizawa K. S-carboxymethylcysteine inhibits neutrophil activation mediated by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002; 449: 183-189.
  17. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 1317-1327.
  18. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 153: 530-534.
  19. Langen RC, Korn SH, Wouters EF. ROS in the local and systemic pathogenesis of COPD. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 226-235.
  20. Langen RC, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *Faseb J* 2001; 15: 1169-1180.
  21. Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *Faseb J* 1998; 12: 871-880.
  22. MacFarlane NG, Miller DJ. Depression of peak force without altering calcium sensitivity by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat. *Circ. Res.*, 1992; 70: 1217-1224.
  23. Melillo E, Melillo G. Fumo di tabacco e stress ossidativo respiratorio. *Tabaccologia* 2004; 1: 29-33.
  24. Montuschi P, Collins JV, Ciabattini G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000; 162: 1175-1177.
  25. Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999; 159: 473-479.
  26. Mostert R, Goris A, Weling-Scheepers C, Wouters EF, Schols AM. Tissue depletion and health related quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.*, 2000; 94: 859-867.
  27. Mura M. Mucolitici e mucoregolatori nel trattamento della broncopneumopatia cronica ostruttiva. *Tabaccologia*, 2005; 2: 27-30.
  28. Mura M, Milic-Emili, J. Può il danno meccanico delle vie aeree periferiche giocare un ruolo nella genesi della Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva nei soggetti fumatori? *Tabaccologia*, 2005; 1: 18-20.
  29. Mura M, Zagà V, Fabbri M. Strategie di oncoprevenzione con antiossidanti nei confronti dei radicali liberi del fumo di tabacco. *Tabaccologia*, 2003; 3: 23-28.
  30. Murray C, Lopez, AD. Alternative visions of the future: projecting mortality and disability. In: Murray CJL, AD, ed. *The global burden of disease*. Harvard: Harvard University Press, pp. 361-75, 1996.
  31. Noguera A, Busquets X, Saulea J, Villaverde JM, MacNee W, Agusti AG. Expression of adhesion molecules and G proteins in circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998; 158: 1664-1668.
  32. Palange P, Forte S, Felli A, Carlone S. Nutritional status and exercise performance in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Monaldi Arch. Chest Dis.*, 1993; 48: 543-545.
  33. Polkey MI, Kyroussis D, Hamnegard CH, Mills GH, Green M, Moxham J. Diaphragm strength in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 154: 1310-1317.
  34. Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbo N, Alonso J, Gonzalez de Suso JM, Vilaro J, Barbera JA, Polo MF, Argiles JM, Fernandez-Checa JC, Roca J. Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001; 164: 1114-1118.
  35. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 154: 1055-1060.
  36. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Oxidative Stress Study Group. Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997; 156: 341-357.
  37. Rutgers SR, Postma DS, ten Hacken NH, Kauffman HF, van Der Mark TW, Koeter GH, Timens W. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Chest*, 2000; 117: 2625.
  38. Sadowska AM, van Overveld FJ, Gorecka D, Zdral A, Filewska M, Demkow UA, Luyten C, Saenen E, Zielinski J, De Backer WA. The interrelationship between markers of inflammation and oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: modulation by inhaled steroids and antioxidant. *Respir. Med.*, 2005; 99: 241-249.
  39. Saetta M, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Lucchini RE, Casoni G, Maestrelli P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997; 156: 1633-1639.
  40. Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998; 157: 1791-1797.
  41. Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993; 147: 1151-1156.
  42. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.*, 2000; 88: 1474-1480.
  43. Strachan DP, Cox BD, Erzincinoglu SW, Walters DE, Whitchelow MJ. Ventilatory function and winter fresh fruit consumption in a random sample of British adults. *Thorax*, 1991; 46: 624-629.
  44. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, Yuki H, Kato S, Tomoike H. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000; 161: 1179-1184.
  45. Tudor RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, Flores SC. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2003; 29: 88-97.
  46. Vina J, Servera E, Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Ferrero JA, Garcia-De-La-Asuncion J, Anton V, Marin J. Exercise causes blood glutathione oxidation in chronic obstructive pulmonary disease: prevention by O2 therapy. *J. Appl. Physiol.*, 1996; 81: 2198-2202.
  47. Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Systemic effects in COPD. *Chest*, 2002; 121: 1275-1305.
  48. Wouters FM. local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2005; 2: 26-33.
  49. Zagà V, Mura M, Fabbri M. Ruolo oncogenetico dei radicali liberi dell'ossigeno nel fumo di tabacco. *Tabaccologia*, 2003; 2: 27-32.
  50. Zagà V, Gattavecchia E. Radicali liberi e fumo di sigaretta. *Giorn. It Mal Tor*, 2002; 56: 5375-391.
  51. W-Dahl A, Toksvig-Larsen. Cigarette smoking delays bone healing: a prospective study of 200 patients operated on by the hemicallotaxis technique. *Acta Orthop Scand*, 2004; 75(3): 347-51.
  52. Fletcher C., Peto R. Tinker C., et al., *The Natural History of Chronic Bronchitis and emphysema*. Oxford, Oxford University Press, 1976.